

10 / 530353

06 APR 2005

PCT/JP03/12680

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

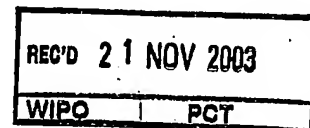
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年10月 7日

出願番号  
Application Number: 特願2002-294071

[ST. 10/C]: [JP2002-294071]

出願人  
Applicant(s): 科学技術振興事業団

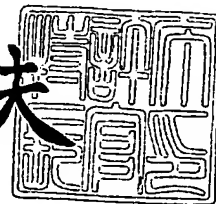


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3091698

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02366-JN

【提出日】 平成14年10月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/00  
C12N 5/02

【発明の名称】 好酸球カチオン性タンパク質を含有する組成物

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市門田文化町 2 - 1 0 - 1 3

【氏名】 妹尾 昌治

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田 7 - C - 1 0 4

【氏名】 黒田 俊一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘 2 - 3 0 - 2

【氏名】 谷澤 克行

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市西市 4 4 2 - 4  
ソレイユハルミ 1 0 5 号

【氏名】 北添 翠

【発明者】

【住所又は居所】 京都府八幡市男山八望 2 番地 C - 1 8 - 5 0 8

【氏名】 岩田 美紀

【発明者】

【住所又は居所】 三重県上野市桑町 1 4 0 7 番地の 1

【氏名】 藤田 敏次

【発明者】

【住所又は居所】 京都府亀岡市南つつじヶ丘大葉台2丁目6-7

【氏名】 朴井 伸行

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 好酸球カチオン性タンパク質を含有する組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と薬理学的成分とを含有することを特徴とする組成物。

【請求項 2】 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患が、心臓疾患、骨疾患または、神経変性疾患である請求項 1 の組成物。

【請求項 3】 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化を促進する培地組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と細胞生物学的成分とを含有する組成物。

【請求項 4】 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞に候補物質を接触させ、好酸球カチオン性タンパク質と同程度またはそれ以上に細胞の生存維持および／または細胞分化を促進させる物質を目的物質として特定することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 5】 細胞が、神経細胞、骨細胞、心筋細胞または線維芽細胞である請求項 4 のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、好酸球カチオン性タンパク質を含有する組成物に関するものである。さらに詳しくは、この出願は、好酸球カチオン性タンパク質の新規生理活性を利用する治療用組成物と細胞培地組成物、並びに好酸球カチオン性タンパク質の生理活性を指標とするスクリーニング方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

好酸球カチオン性タンパク質 (eosinophil cationic protein: 以下「ECP」と

記載する)は、好酸球の活性化に伴って発現が上昇するタンパク質であり、塩基性顆粒中に存在する(非特許文献1)。このECPは、寄生虫殺傷、神経毒、リンパ球増殖抑制、殺菌、ヒスタミン遊離、リボヌクレアーゼ、凝固時間短縮等の活性を有することが知られており(非特許文献2)、特にそのヒスタミン遊離活性はアレルギー反応を惹起することから、ECPの発現抑制を薬理作用とする抗アレルギー薬が提案されている(特許文献1)。またこのECPを含む好酸球細胞株を喘息薬や抗アレルギー薬のスクリーニングに利用することも提案されている(特許文献2)。

**【0003】****【特許文献1】**

特表2002-500506号公報

**【特許文献2】**

特開平05-111382号公報

**【非特許文献1】**

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986, 83(10): 3146-3150

**【非特許文献2】**

日本臨床 1993, 51(3):60(606)

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

前記のとおり、ECPの生理活性はこれまで、細菌や動物細胞に対する毒性や増殖抑制であると認識されてきた。

**【0005】**

これに対し、この出願の発明者らは、ECPが動物細胞の生存維持や分化促進といった新規の生理活性を有することを見出した。

**【0006】**

この出願の発明は、発明者らが見出したECPの新規活性を利用した新しい組成物を提供することを課題としている。

**【0007】**

またこの出願は、ECPの新規活性を指標として、細胞の生存維持や分化を促進

させることを薬理作用とする治療薬剤を開発するための新しい方法を提供することを課題としている。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と薬理学的成分とを含有することを特徴とする組成物を提供する。

#### 【0009】

この第1発明の組成物においては、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患が、心臓疾患、骨疾患または、神経変性疾患であることを好ましい態様としている。

#### 【0010】

またこの出願は、第2の発明として、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化を促進する培地組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と細胞生物学的成分とを含有する組成物を提供する。

#### 【0011】

さらにこの出願は、第3の発明として、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞に候補物質を接触させ、好酸球カチオン性タンパク質と同程度またはそれ以上に細胞の生存維持および／または細胞分化を促進させる物質を目的物質として特定することを特徴とするスクリーニング方法を提供する。

#### 【0012】

この第3発明においては、細胞が、神経細胞、骨細胞、心筋細胞または線維芽細胞であることを好ましい態様としている。

#### 【0013】

すなわち、この出願の発明者らは、従来は細胞毒性や細胞の増殖抑制を生理活性とするものと考えられてきたECPについて、以下のとおりの新たな活性を見出

した。

- (1) 線維芽細胞の増殖促進とストレスファイバーの形成促進。
- (2) 心筋細胞の筋繊維の成熟と、拍動数の上昇。
- (3) 低血清または無血清培地での神経細胞の生存率の向上。
- (4) 骨芽細胞の分化促進。

#### 【0014】

そしてまた、前記の活性は、細胞のシグナル伝達経路において重要な役割を果たしている低分子量Gタンパク質Rhoキナーゼの基質 (ROCK) に対する阻害剤によって抑制もしくは消失することから、ECPが細胞のシグナル伝達経路に作用し、前記(1)～(4)の活性をもたらすことを見出している。

#### 【0015】

この出願の発明は、以上のとおりの新規な知見を基礎とするものである。以下、この出願の各発明について、実施形態を詳しく説明する。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

この出願の各発明において使用するECPは、ヒトをはじめとする各種哺乳動物の細胞（白血球や造血幹細胞）から公知の方法によって単離することができる。また、そのアミノ酸発列（ヒトECP：GenBank/X15161、チンパンジー：GenBank/AF294028、ゴリラ：GenBank/U24097）等に基づいて公知の固相ペプチド合成法により化学合成して作製することもできる。あるいは、それぞれのペプチドをコードするポリヌクレオチドをin vitro転写翻訳系や適当な宿主ベクター系で発現させることによって、組換えECPとして取得することができる。ポリヌクレオチド（例えばECP cDNA）は前記GenBankデータベースの塩基配列情報に基づき作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて既存のcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCR法等の公知の方法により取得することができる。

#### 【0017】

例えば組換えECPをin vitro転写翻訳で作製する場合には、前記ポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクタ

ーを作製し、このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

#### 【0018】

組換えECPを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のDNA断片を組換えた発現ベクターを作成し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

#### 【0019】

また組換えECPを真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とするタンパク質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

#### 【0020】

発現ベクターを宿主細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

#### 【0021】

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から組換えECPを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせる行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析



や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

#### 【0022】

なお、ECPは分泌性タンパク質であり、例えばヒトECPの場合にはそのN端側の23アミノ酸配列が分泌シグナルである。従って、原核細胞や真核細胞で組換えECPを発現させる場合には、その培養物からの組換えECPの回収効率を考慮して、分泌シグナル配列よりC端側（例えば第28位Arg以降）の活性領域を発現させることが好ましい。

#### 【0023】

第1発明の組成物は、前記のとおりECPと薬理学的成分とを含有することを特徴とする医療用組成物であり、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とするヒト疾患の治療に用いられる。すなわち、このような疾患は生体の各種組織細胞の正常なライフサイクル（増殖、分化、細胞死等）の異常によって発症する疾患であり、遺伝や様々な細胞障害物質を原因とする各種の疾患を対象とすることができる。特に、心臓疾患、骨疾患および神経変性疾患の完治、寛解または症状の改善に使用することができる。心臓疾患としては、心筋の細胞骨格の形成以上や変性等を原因とする心筋梗塞、心筋炎、心筋症（拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、内腔閉鎖型心筋症等）、心筋線維症などである。骨疾患としては、特に造骨細胞（骨芽細胞）の分化障害を原因とする骨粗鬆症や歯周病である。またこの治療用組成物は骨折後の骨組織再生のためにも使用することができる。神経変性疾患としては、神経細胞の変性や細胞死を原因とするアルツハイマー病、老年性痴呆、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、ニューロパチー等である。

#### 【0024】

この第1発明の医療用組成物の成分である「薬学的成分」とは、第1には、通常の薬剤製造に用いられる各種の担体を意味する。担体は、対象疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜に選択することができるが、この発明の医療用組成物は、経口的にまたは注射により投与しうる単位服用形態にあること

が望ましい。特に、注射による投与の場合には、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注入等を採用することができる。

#### 【0025】

懸濁剤およびシロップ剤のような経口液体調製物は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。

#### 【0026】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤およびカプセル剤は、投与が容易であるという点において、この発明の組成物における好ましい単位投与形態である。錠剤やカプセルを製造する際には、固体の製薬担体が用いられる。

#### 【0027】

また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

#### 【0028】

この発明の医療用組成物の投与量は、患者の年齢や体重、症状、投与経路等によって異なるが、ECPの血中濃度が $10\text{nmol}$ ～ $0.1\text{mmol}$ 、好ましくは $5\text{nmol}$ ～ $0.5\text{mmol}$ 程度となる量を投与すればよい。

#### 【0029】

薬学的成分の第2は、ECPを細胞内に導入可能な形態とするための成分である。例えば、このポリペプチドの構造や機能を変更することなく、かつ薬理学的に

許容される溶液にこのポリペプチドを混合して組成物とすることができる。このような組成物は、例えばマイクロインジェクション法により細胞内に導入する方法や、脂質（例えば、BioPORTER (Gene Therapy Systems社、米国)、Chariot (Active Motif社、米国) 等) を用いた細胞内導入法によって標的細胞に導入することができる。

#### 【0030】

薬学的成分の第3は、ECPをコードするポリヌクレオチドを細胞内に導入可能な形態とするための成分である。すなわち、ポリヌクレオチドを真核細胞用の発現ベクターに組み込み、このベクターを、例えば生体認識分子を提示した中空ナノ粒子、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等に組み込むようにすればよい。このような組成物は、遺伝子治療の手法により生体内の標的細胞に導入することができる。

#### 【0031】

この出願の第2の発明は、好酸球カチオン性タンパク質と細胞生物学的成分とを含有する培地組成物であって、培養細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化を促進させるための使用することができる。

#### 【0032】

「細胞生物学的成分」とは、細胞の生存、増殖、分化等に必須の成分であって、具体的には通常の動物細胞培地を構成する成分である。具体的には、緩衝液（リン酸塩-炭酸水素ナトリウムと二酸化炭素ガスなど）、塩類、グルコース、ビタミン、アミノ酸等の有機物質、血清（ウシ胎児血清：FBS）や栄養因子（Growth Factor in Serum：GFS）等である。これらの成分とECPとを適宜に混合することによってこの発明の培地組成物を製造することができる。各成分の含有量は通常の動物培養培地と同程度とすることができる。ECPは、細胞の種類や目的に応じて適宜とすることができるが、培地1mlに対して0.001～10 $\mu$ 程度とすることができる。「細胞」は、通常の動物細胞の対象となる細胞を用いることができるが、特に、神経細胞、骨細胞、心筋細胞、線維芽細胞等が好ましい。またこれらの細胞は、動物組織から単離した初代細胞、継代細胞、株化細胞、あるいは外来遺伝子を導入した形質転換細胞であってもよい。「培養」は、浮遊細胞の場合には

浮遊培養、接着性細胞の場合には単層培養または3次元培養として行うことができる。また中空性ポリマー管内でのホロファイバー培養としてもよい。

#### 【0033】

この第2発明の培地組成物を用いた培養によって、培養細胞を長期間に渡って生存させ、または機能発現のために分化させることができる。このため、この組成物を用いた培養系は、細胞の生存、細胞骨格形成、増殖、分化といった細胞生物学的現象、あるいはこれらの現象を司るシグナル伝達カスケード（特にRhoキナーゼ経路）の解明に有用である。また、この組成物は、細胞を機能発現状態に分化させ、あるいは細胞を長期間に渡って生存させることができるため、有用物質の製造（バイオリアクター等）にも利用することができる。

#### 【0034】

さらに、この発明の培地組成物は、ECPを含有することによって、低血清や無血清であっても神経細胞等を長期間に渡って生存させることができる。このため、ECP以外のタンパク質成分が少ない、または全くない状態で細胞機能を解析することができるため、細胞の特定機能に作用するタンパク質因子等をスクリーニングするための系としても有用である。

#### 【0035】

この出願の第3の発明は、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の促進作用を有する、ECP以外の新規因子を特定するためのスクリーニング方法である。すなわち、細胞に候補物質を接触させ、その細胞の生存期間あるいは分化状態を測定する。そして、この測定値が、ECPを細胞に接触させた時の測定値と同程度またはそれ以上である場合に、試験した候補物質が目的因子であると決定することができる。細胞の生存は、例えばトリパンブルー染色法等の公知の方法で行うことができる。細胞の増殖は、一定期間の培養後の生細胞数を計測することによって行うことができる。また細胞の分化は、分化細胞に特有のマーカーを対象とする免疫染色やウエスタンブロット分析、RT-PCR法等によって行うことができる。

#### 【0036】

細胞は、ECPの接触によってその生存期間を延長させる細胞、増殖または分化

を促進させる細胞であり、具体的には、神経細胞、骨細胞、心筋細胞、線維芽細胞等が好ましい。またこれらの細胞は、動物組織から単離した初代細胞、継代細胞、株化細胞、あるいは外来遺伝子を導入した形質転換細胞であってもよい。これらの細胞は、通常の動物細胞培養と同一の条件下で試験することができる。なお、細胞の生存を試験する場合には、血清や成長因子が存在しない条件下で培養することが好ましい。さらに、これらの細胞は、動物個体内にある細胞であってもよい。

#### 【0037】

「候補物質」は、例えば、未知および既知の有機または無機化合物、タンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド等である。これらの候補物質を細胞に接触させる場合には、候補物質を培養細胞の培地に添加する方法、培養細胞または動物個体内の細胞に候補物質を導入する方法（マイクロインジェクションや脂質による細胞内導入法）等を採用することができる。また、候補物質がポリヌクレオチドやオリゴヌクレオチドの場合には、その発現ベクターを公知の方法で細胞にトランスフェクションしたり、遺伝子治療の方法に準じて動物個体にウイルスベクターを感染させてもよい。

#### 【0038】

このスクリーニング方法によって特定される新規因子は、単独で、またはECPとの組み合わせによって、治療用組成物や培地組成物の有効成分となりうる。

#### 【0039】

以下、実施例として、ECPの新規生理活性を確認するために行った試験研究の結果を示して、この出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

#### 【0040】

##### 【実施例】

実施例 1：正常組織由来細胞株の増殖に対するECPの効果

マウス線維芽細胞株（BALB/c 3T3）、大動脈平滑筋細胞株（A10）、マウス乳腺内皮細胞株（HC-11）およびヒト臍帯血管内皮細胞株（HUVEC）の増殖に対するECPの効果を、10% FBSの存在下で解析した。まず、96穴培養プレートの10% FBS

含有DMEM培養液中に500 cells/wellになるように各細胞を播種した。24時間、5% CO<sub>2</sub>に維持した培養庫で培養し、0から10  $\mu$ Mの各濃度のECPおよびRNaseAを添加し、48時間、同じ培養庫で培養を続けた。そして、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) を添加し、各細胞の増殖率を求めた。

#### 【0041】

その結果を図1に示した。この図1から明らかなように、BALB/c 3T3細胞はECPの添加により、細胞増殖が促進されることが確認された。一方その他の細胞株は、ECPによる増殖促進がないか、または増殖が抑制された。

実施例2: BALB/c 3T3細胞増殖に対するECPの効果

96穴培養プレートの10% FBS含有DMEM培養液中にBALB/c 3T3 A31-K細胞を1000 cells/wellの濃度で播種した。24時間後、最終濃度1  $\mu$ MのECPまたはRNaseAをそれぞれ培養液中に添加した。48時間培養を続けた後に生細胞数を測定した。

#### 【0042】

結果は図2に示したとおりである。ECPは何れの濃度においても有意に細胞増殖を促進させた。一方、RNaseAには増殖促進効果は見られなかった。

実施例3: BALB/c 3T3細胞増殖の経時変化に対するECPの効果

96穴培養プレートの10% FBS含有DMEM培養液中にBALB/c 3T3細胞を1000 cells/wellの濃度で播種した。培養24時間後、1  $\mu$ M ECPまたは1  $\mu$ M RNaseAをそれぞれ1 ng/mlになるように培養液中に添加した。4日間培養を続け、24時間ごとに生細胞数を測定した。なお、培養2日目に培養液の交換を行った。

#### 【0043】

結果は図3に示したとおりである。培養2日目の培地交換ののち、ECP添加条件では細胞の増殖が著しく促進された。

実施例4: 低血清条件下でのBALB/3T3細胞増殖に対するECPの効果

24穴培養プレートの10% FBS含有DMEM培養液に、 $2 \times 10^4$  cells/wellになるようにBALB/c 3T3細胞を播種し培養した。24時間後、培養細胞が安定したら、0.5% FBSを含むDMEM培養液に培地を交換して培養を続けた。24時間後、1  $\mu$ MのECPおよびRNaseA、60pMのbFGFをそれぞれ組み合わせて培養液に添加し、さらに48時間培

養を行った後、各条件下で培養した細胞を位相差顕微鏡（対物レンズ×20）にて観察した。

#### 【0044】

結果は図4に示したとおりである。細胞はbFGF単独で増殖したが、bFGF+ECPの条件でさらに顕著な細胞増殖効果が観察された。

実施例5：低血清条件下でのBALB/c 3T3細胞骨格分子に対するECPの効果

24穴培養プレートに予め滅菌した直径15mmの丸型カバーガラスを置き、0.1%ゼラチンを含む1×リン酸緩衝液（PBS）を各ウェルにカバーガラスが十分浸たる程度に入れて、30分間室温に放置し、カバーガラスをゼラチンコートした。各ウェルに10% FBS含有DMEM培養液を充填し、BALB/c 3T3細胞を $2 \times 10^4$  cells/wellになるように播種して培養した。24時間後、0.5% FBS含有DMEM培養液に培地を交換した。さらにその24時間後、 $1 \mu\text{M}$  のECPまたはRNaseAをそれぞれ培養液に添加した。6時間後にBALB/c 3T3細胞が生育したカバーガラスをウェルから取り出して、1×PBSで2-3回洗浄した後、カバーガラスを4%フォルムアルデヒド（和光純薬工業社）に室温で10分間浸して細胞を固定した。次に、1×PBSで2-3回洗浄し、0.1% Trton-X100を含む1×PBSに10分間浸して細胞膜を溶解させ、1×PBSで2-3回再度洗浄し、0.5% BSA/PBSに浸けて室温で30分間放置し、この操作中のBSAによって非特異的吸着部分をブロックした。1次抗体を含むPBSで $11 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、細胞をこの抗体希釈液に30分間浸し、1次抗体反応を行った。1次抗体は、F-actin、vinculinおよびF-actinとvinculinの混合の3種類を用いた。

#### 【0045】

次に、5分毎に新しい1×PBSに交換・洗浄を行い、2次抗体としてRITC結合型ヤギ抗マウスIgG抗体（CHEMICON社）を $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{M}$ のFITC-phalloidin/メタノール（Molecular Probes社）を100nMになるように1×PBS中で混合し、細胞をこの抗体希釈液に30分間浸して反応させた。その後、5分毎に新しい1×PBSに交換・洗浄し、等量の1×PBS：グリセロール溶液を挟んで前記の丸型カバーガラスをスライドガラスに落とし、共焦点レーザー顕微鏡（MRC-1024、Bio-Rad社）で観察した。

#### 【0046】

結果は図5に示したとおりである。ECPを加えた場合の細胞群には、多くの細胞骨格分子（ストレスファイバー）の形成が増加（矢印）していることが確認された。

#### 【0047】

また、 $1\mu\text{M}$  のECPまたはRNaseAに加え、それぞれ60pMのbFGFを添加して同様に細胞骨格形成を観察した。

#### 【0048】

結果は図6に示したとおりであり、ECPとbFGFの共存下では細胞骨格分子がより顕著に形成されることが確認された。

実施例6：ECPによる細胞骨格形成に対するROCK阻害剤の効果

24穴培養プレートでBALB/3T3細胞および同細胞のクローンA31-11-1細胞を $1\times 10^4$  cells/wellで播種し培養し、24時間後に0.5% FBS含有DMEM培養液に培地を交換し、培養を続けた。そのさらに24時間後、 $1\mu\text{M}$ のECPまたはRNaseAとともに、 $10\mu\text{M}$ のROCK阻害剤（Y27632）を添加した。6時間後細胞を回収し、抗体染色を行い、顕微鏡（対物レンズ $\times 40$ ）で細胞骨格の形成を観察した。

#### 【0049】

結果は図7に示したとおりである。ROCK阻害剤を添加することによって、ECPによるストレスファイバー形成促進が阻害されたことから、ECPによる細胞骨格形成にはRhoキナーゼが関与していることが確認された。

実施例7：新生仔ラット由来の心筋細胞に対するECPの効果

心筋培養細胞をSFM（ $2\mu\text{M}$  BrDU、100unit/mlペニシリン、 $100\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン）中で48時間培養して脱分化させた。その後、培養液を交換し、最終濃度100ng/mlのECPを添加し、さらに24時間後、 $1\times\text{PBS}$ で10分間、3回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドに30分間室温で浸し、細胞を固定した。そして、0.25% Triton-X100を含むPBSに15分間室温で浸し、BSA含有のブロッキングバッファーに、抗ENH1抗体を1:40の割合で、抗アクチニン抗体は1:100の割合で添加し、 $4^\circ\text{C}$ で一晩浸し反応させた。次に、0.03% Triton-X100含有PBSで20分間洗浄し、これを3回繰り返した。ブロッキングバッファーにCy3標識抗マウスおよびCy2標識抗ウサギをそれぞれ1:250になるよう添加し、 $4^\circ\text{C}$ で4時間反応させた。反応後



、再度0.03% Triton-X100含有PBSで20分間洗浄し、これを3回繰り返す、水分を除去して、90%グリセロールを加えた。

#### 【0050】

図8は免疫蛍光染色の結果である。この図8に示したように、ECPによって心筋細胞に心肥大化作用が確認された。

実施例8：新生仔ラット由来の心筋細胞の拍動数に対するECPの効果

新生仔ラットから単離した心筋細胞を、実施例7と同様にして脱分化し、ECP (1ml当たり10ng、100ngまたは1 $\mu$ g) を培養液に添加して、その24時間後に拍動数を計測した。

#### 【0051】

結果は図9に示したとおりである。心筋細胞拍動数がECP用量依存的に増加することが確認された。

#### 【0052】

さらに、このECPの心筋細胞拍動数の増加効果に対するROCK阻害剤 (Y27632) の効果を試験した。Y27632の添加量は0、5、10または15 $\mu$ Mとし、ECP濃度は100ng/mlとした。

#### 【0053】

結果は図10に示したとおりである。ROCK阻害剤によって、ECPによる拍動数の増加が消失することから、このECP活性がシグナル伝達カスケードにおけるRhoキナーゼ経路に依存することが確認された。

実施例9：神経様PC12細胞の無血清条件下での細胞生存に対するECPの効果

PC12細胞を96穴培養プレートで、 $1 \times 10^4$  cells/well/100 $\mu$ lで一晩培養した。培地は、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するDMEM培養液を使用した。その後、150 $\mu$ lのDMEMで1回洗浄し、100 $\mu$ lのECP、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するDMEM培養液に培地を交換し、72時間培養を行い、生存細胞数をCellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assay (No. G7570; Promega社) で計測した。

#### 【0054】

結果は図11に示したとおりである。ECP添加によって、神経細胞の生存が維

持されることが確認された。

実施例 10: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性に対する ECP の効果

MC3T3-E1 を 24 穴培養プレート中の  $\alpha$ -MEM 培地に播種し、ECP (最終濃度として 1ml 当たり 1ng、10ng、100ng または 1 $\mu$ g)、BMP-4 (100ng/ml) または bFGF (100ng/ml) を添加した。72 時間後、細胞を 10mM Tris-HCl (pH7.2) 溶液で 2 回洗浄し、0.1% Triton-X100 含有の 10mM Tris-HCl (pH7.2) 溶液で溶解した。次に、前記細胞溶解液を 15 秒間、超音波処理して細胞を破碎し、この細胞破碎液 100 $\mu$ l と 0.1M アミノメチルプロパノールで pH10.5 に調整した基質溶液 (4mg/ml p-nitrophenyl phosphate および 2mM MgCl<sub>2</sub>) 100 $\mu$ l を混合し、37℃ で 30 分間反応させた。この反応を 0.5M の NaOH にて停止させ、410nm の吸光度を測定した。得られた値を細胞破碎液の総タンパク質量で割り、比活性を算出した。

#### 【0055】

結果は図 12 に示したとおりである。コントロール置を 100% として各添加成分の効果を示した。ECP を 1ng/ml 添加した場合、骨誘導因子の一種である BMP-4 と同等以上の ALP 活性が得られた。

#### 【0056】

##### 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、ECP の新規生理活性に基づく治療用組成物が提供され、細胞の生存、増殖および／または分化の異常を原因とする心臓疾患、骨疾患および神経変性疾患等の治療に新たな途が拓かれる。また、培養細胞の生存期間の延長、増殖促進および／または分化促進のための培地組成物が提供される。さらには、細胞の生存、増殖および／または分化を促進する新規因子を特定するための手段が提供され、さらに有効な治療用組成物の開発が可能となる。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

正常組織由来細胞株の増殖に対する ECP の効果を試験した結果である。黒丸は B ALB/c 3T3 細胞、三角は A10 細胞、四角は HC-11 細胞、白丸は HUVEC 細胞である。

## 【図 2】

BALB/c 3T3細胞の増殖に対するECPの用量依存効果を試験した結果である。

## 【図 3】

BALB/c 3T3の増殖に対するECPの経時効果を試験した結果である。黒丸はEPC、黒四角はRNase、白四角はコントロールである。

## 【図 4】

低血清培地でのBALB/c 3T3増殖に対するECPの効果を試験した結果（位相差顕微鏡像）である。

## 【図 5】

低血清培地でのBALB/c 3T3細胞骨格分子形成に対するECP効果を試験した結果（共焦点レーザー顕微鏡像）である。

## 【図 6】

低血清培地でのBALB/c 3T3細胞骨格分子形成に対するECP+bFGF効果を試験した結果（共焦点レーザー顕微鏡像）である。

## 【図 7】

BALB/c 3T3細胞の細胞骨格形成に対するECP効果とROCK阻害剤の効果を試験した結果（共焦点レーザー顕微鏡像）である。

## 【図 8】

新生仔ラット由来の心筋細胞における細胞骨格形成に対するECP効果を試験した結果（共焦点レーザー顕微鏡像）である。

## 【図 9】

新生仔ラット由来の心筋細胞の拍動数に対するECP効果を試験した結果である。

## 【図 10】

心筋細胞拍動数に対するECPとROCK阻害剤の効果を試験した結果である。

## 【図 11】

無血清培養液における神経様PC12細胞の生存に対するECPの効果を試験した結果である。カラムは、1：ECP添加前、2：ECP 0 ng/ml、3：ECP 10 ng/ml、4：ECP 1000 ng/mlの平均値である。

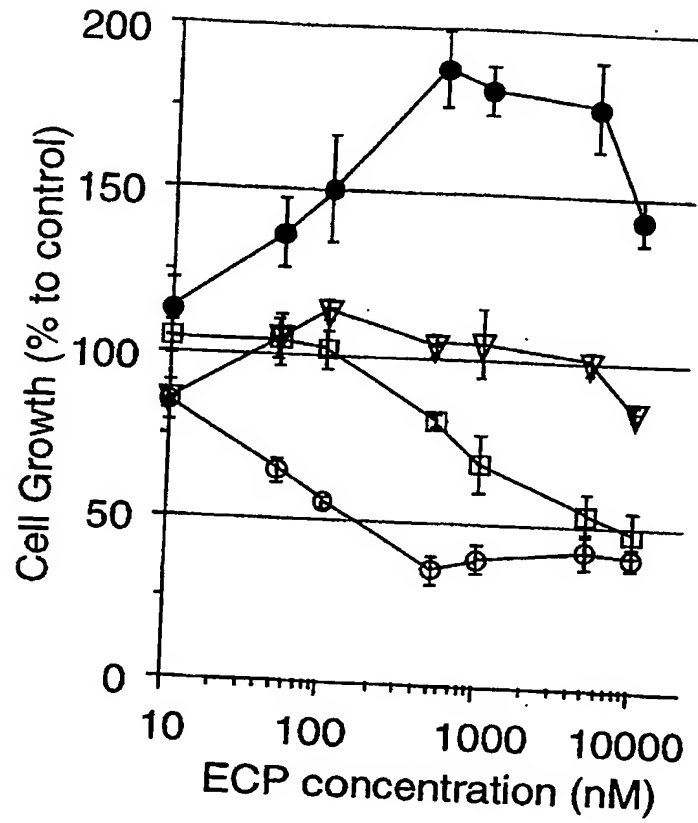
【図 12】

ラット頭蓋冠骨由来のMC3T3-E1細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性に対するECP効果を試験した結果である。

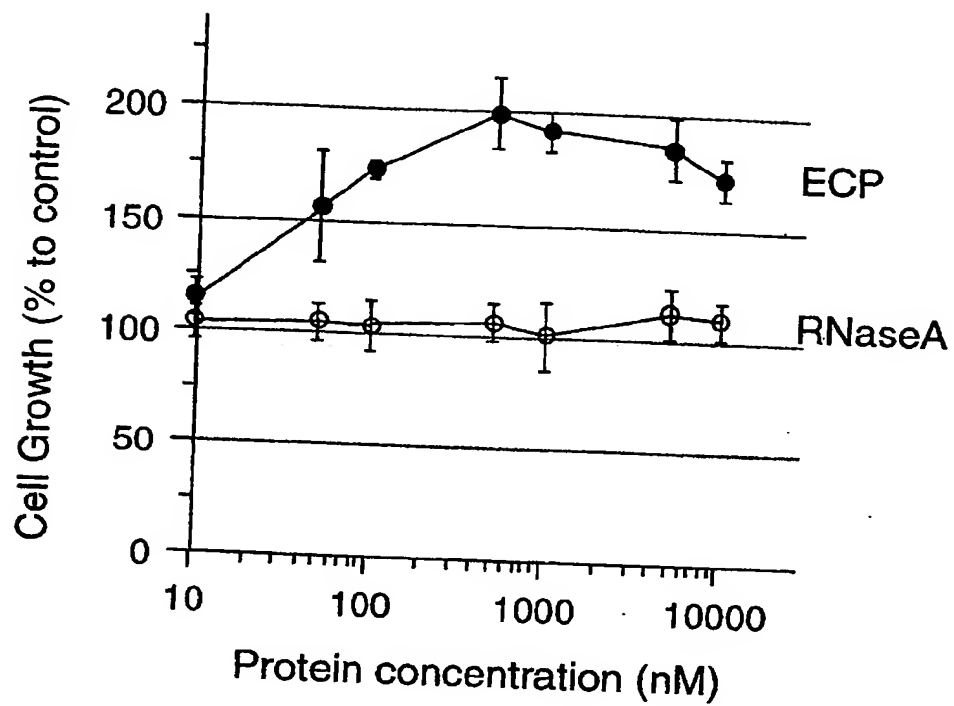
【書類名】

図面

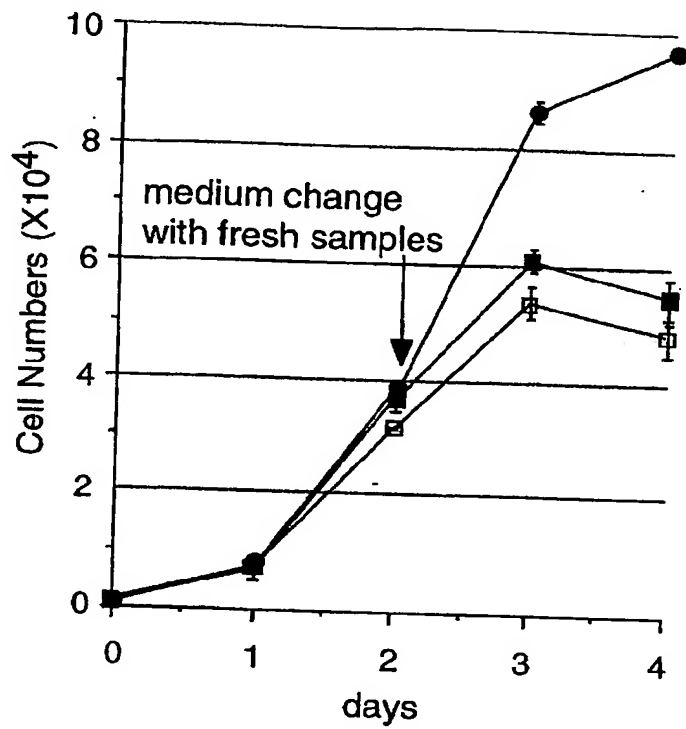
【図 1】



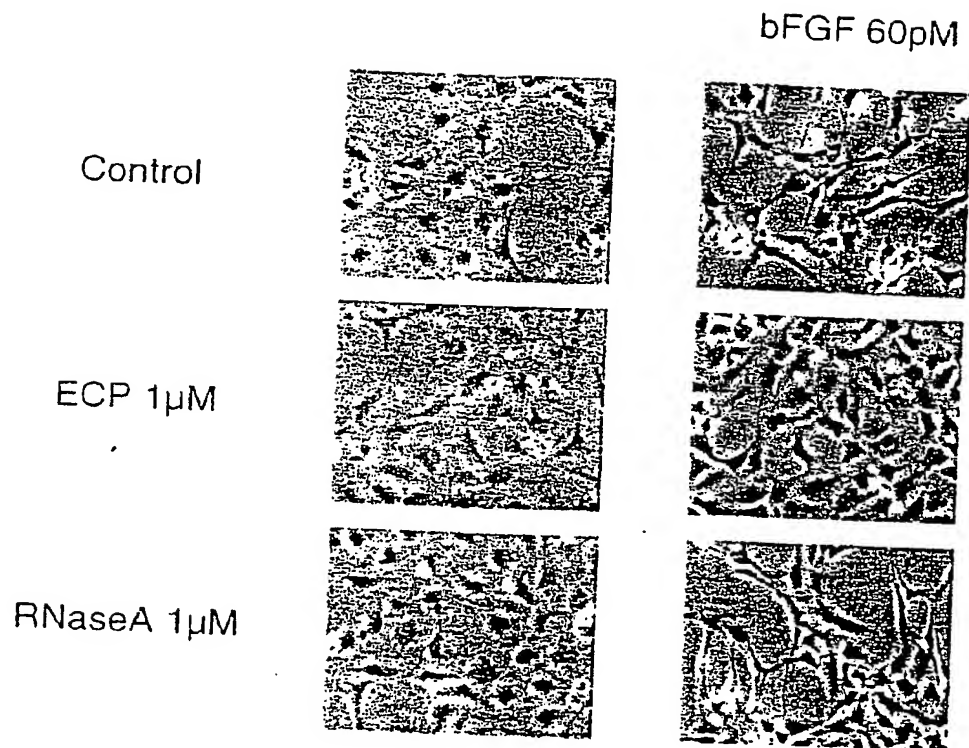
【図 2】



【図3】



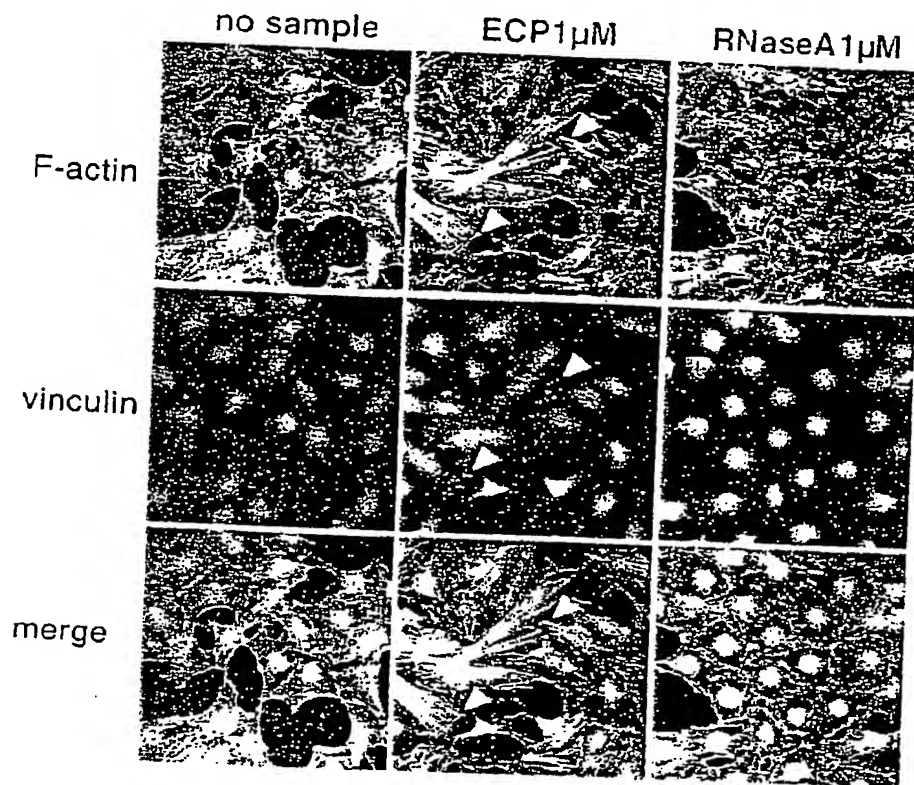
【図 4】





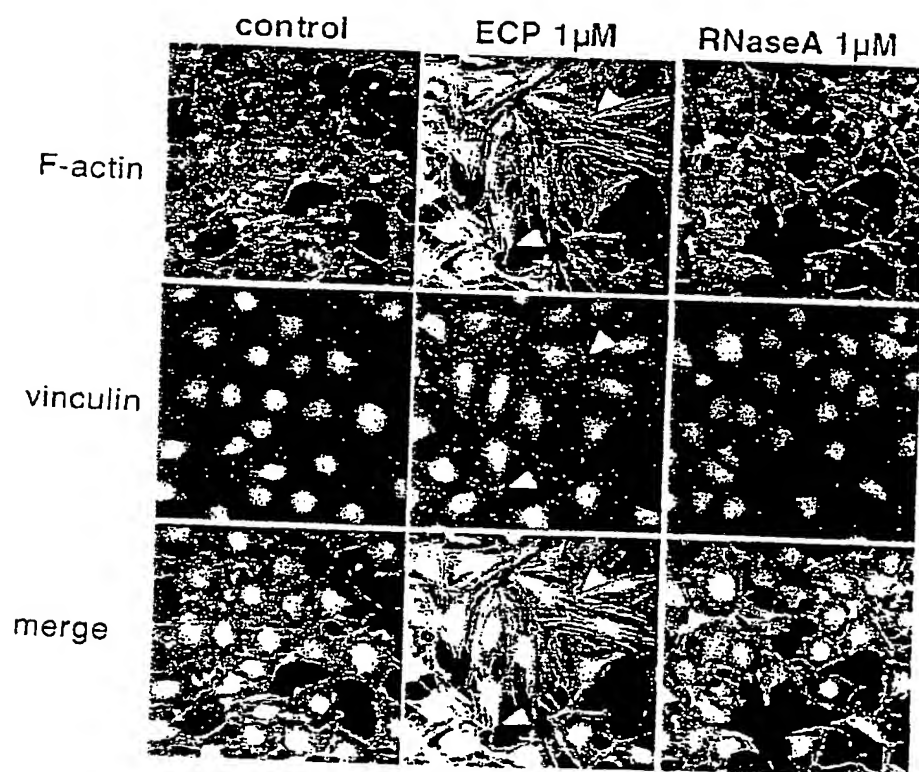
【図5】

-after 6hours-

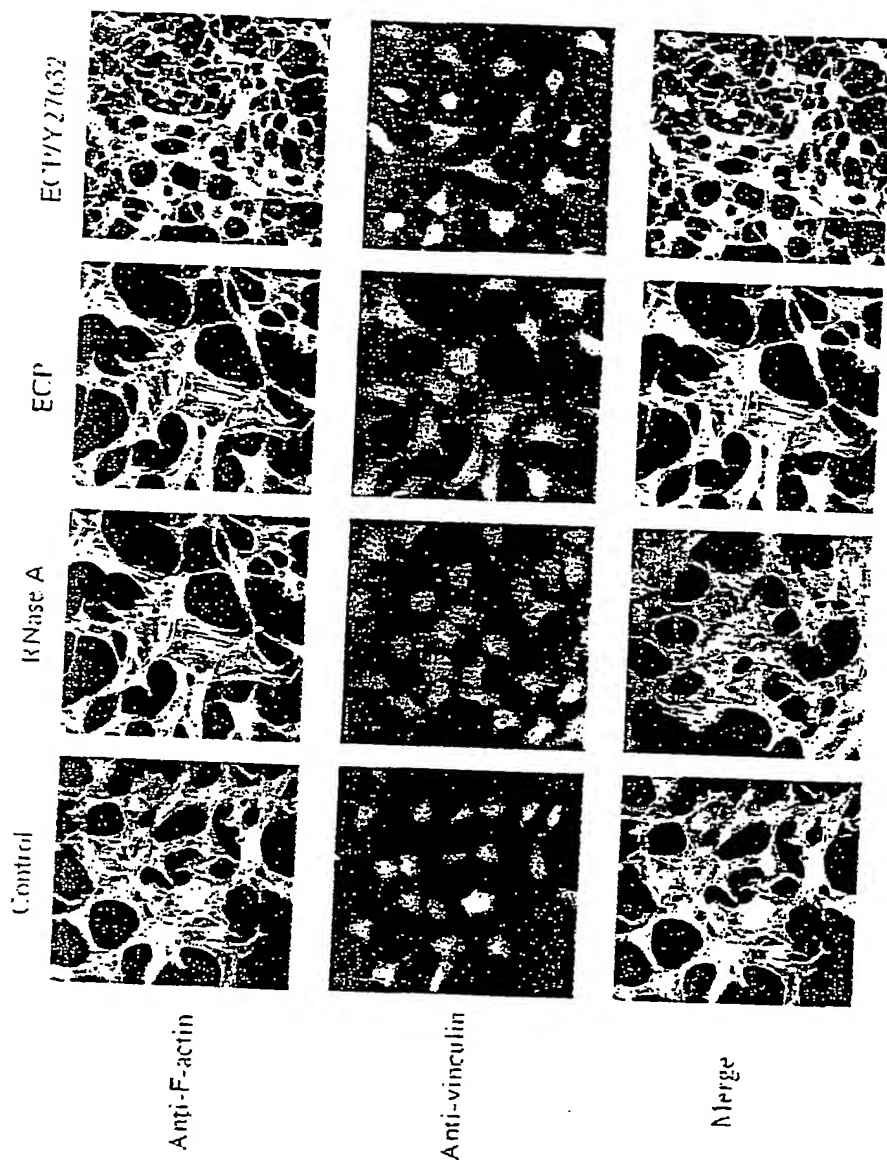


【図6】

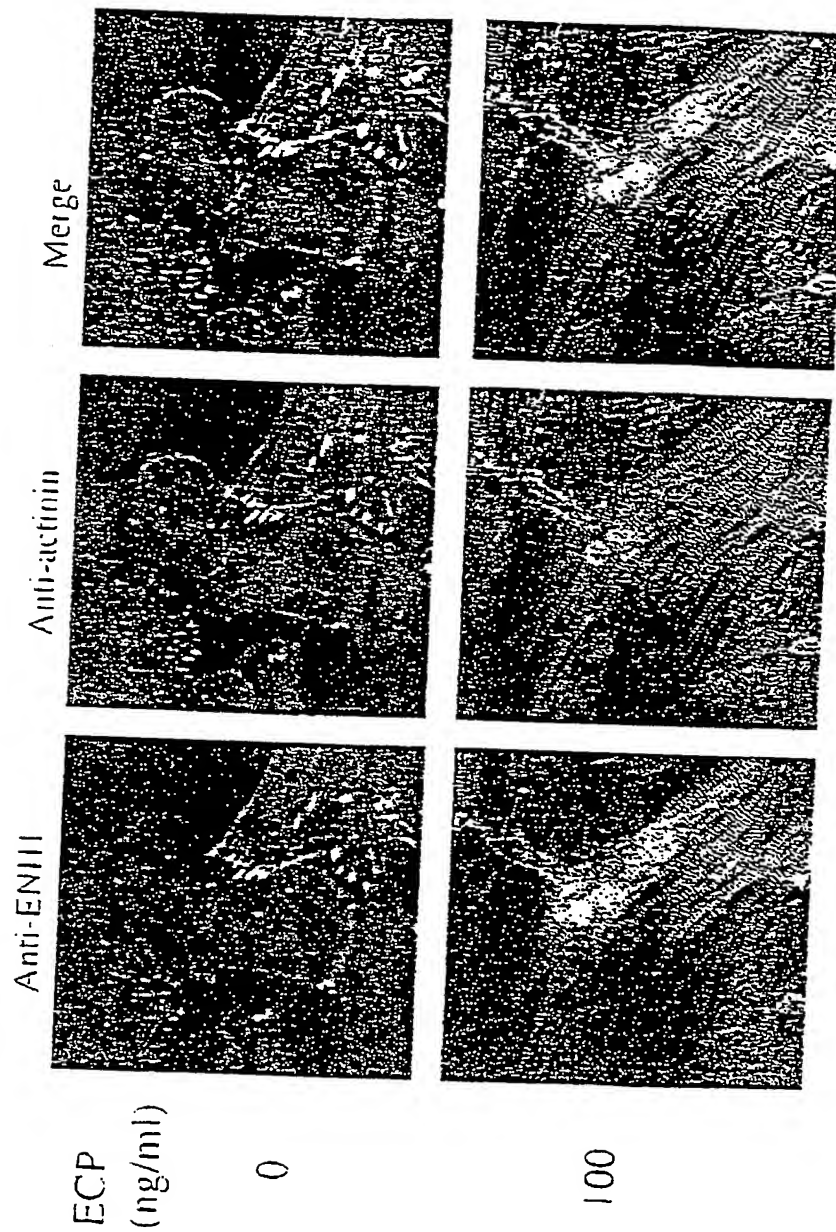
-after 6hours-



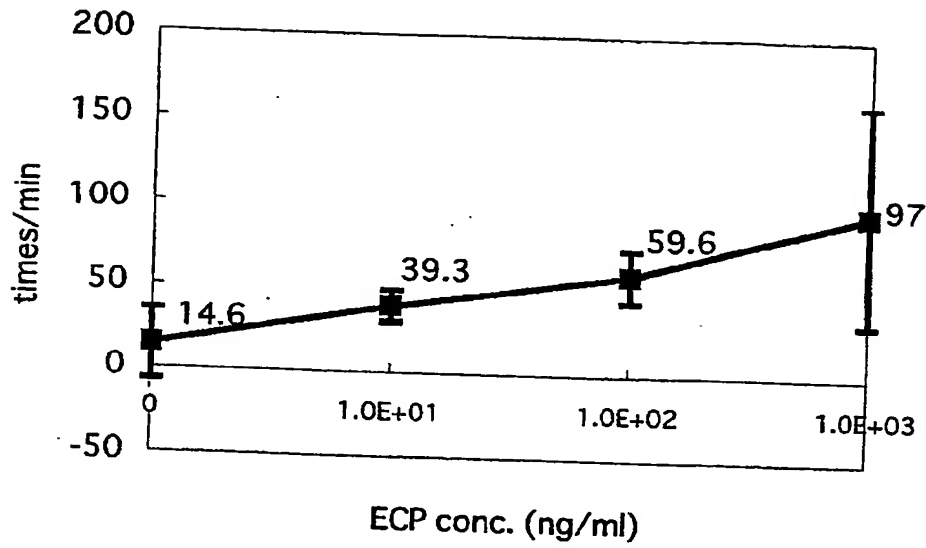
【図7】



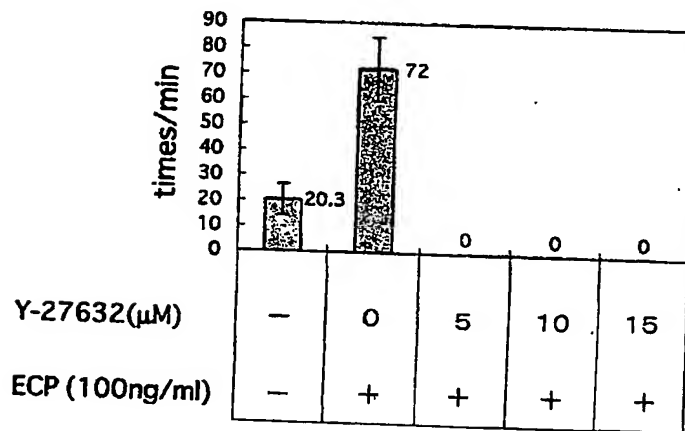
【図 8】



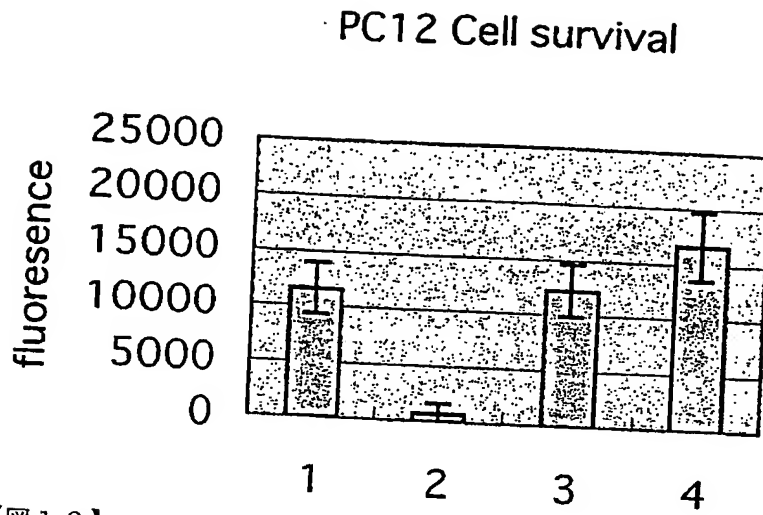
【図 9】



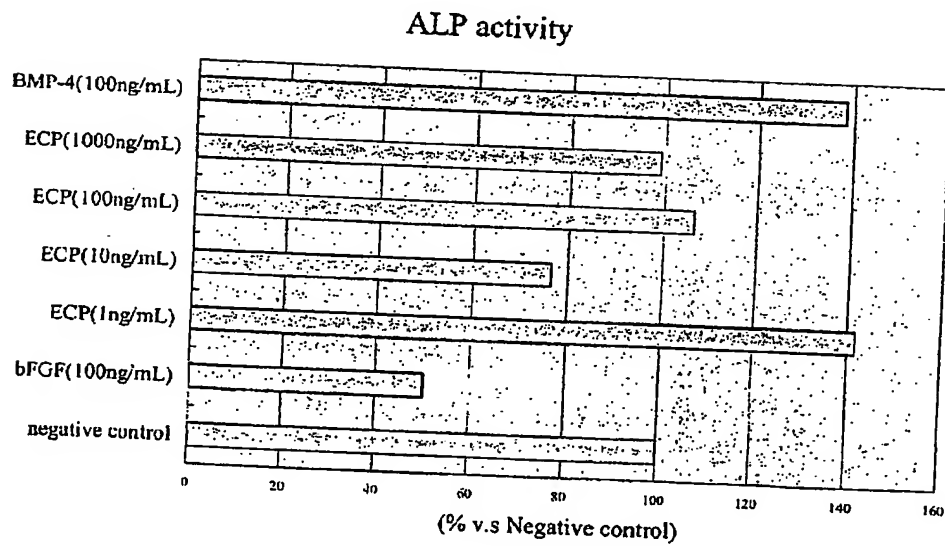
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 好酸球カチオン性タンパク質の新規活性を利用した新しい組成物を提供する

【解決手段】 好酸球カチオン性タンパク質と他の成分とを含有し、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物、および細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化を促進する培地組成物。

【選択図】 なし

特願2002-294071

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

科学技術振興事業団